

РЕФЕРАТ

ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ПРОДУЦЕНТЫ АНТИБИОТИКОВ, ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ГЕН 16S рРНК, ГЕН Б-СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ГИРАЗЫ (*gyrB*), АКТИНОМИЦЕТЫ, БАКТЕРИОФАГИ, КОНСОРЦИУМЫ, ФИКСАЦИЯ АЗОТА, СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ФОСФАТА, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ПЛОДОРОДИЕ ПОЧВ, ДНК-ПОЛИМЕРАЗА, ДНК-НИКАЗА, ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА, ПРОТЕАЗА, СЕКВЕНИРОВАНИЕ, ГЕНОМИКА, МЕТАГЕНОМИКА.

В ходе реализации третьего этапа проекта была проведена организационная и практическая работа по мобилизации более 4 000 гражданских ученых, включающих как школьников и студентов (далее обучающиеся), так и их наставников, учителей школ, пенсионеров, бывших и текущих научных работников и других заинтересованных граждан (далее гражданские ученые). Объектом исследования обучающихся и гражданских ученых являлись микроорганизмы и их консорциумы, изолированные из образцов почвы. В ходе реализации проекта в 2023 году были изготовлены и отправлены в образовательные организации 2000 исследовательских наборов для сбора и первичного скрининга образцов почвы. С помощью данных исследовательских наборов реагентов, разработанных на первом и втором этапах проекта и содержащих все необходимые материалы и инструкцию, из собранных образцов почвы обучающимися были культивированы микроорганизмы и получены колонии микроорганизмов, которые были проанализированы на целевую активность. Кроме того, в рамках реализации проекта в 2023 году исполнителями проекта также были собраны и переданы в научные организации для дальнейшего анализа образцы почвы из мест, как правило, недоступных для сбора образцов школьниками, например техногенных промышленных отвалов, свалок, других труднодоступных мест, включая заповедные зоны, гейзеры и горячие источники, соленые озера, болота и т.д. Сбор всех образцов был проведен в соответствии с разработанным порядком сбора образцов. Общее число образцов почвы, собранных и зарегистрированных в базе проекта за отчетный период, превысило 10 000. Все собранные образцы почвы поступили на хранение в ИХБФМ СО РАН. За отчетный период из данных образцов было культивировано около 4 000 почвенных изолятов, которые затем были переданы отдельным исследовательским группам из ИХБФМ СО РАН и организациям-соисполнителям. В научных организациях-участниках проекта были проведены работы по поиску микроорганизмов-продуцентов антибиотиков, бактериофагов, ассоциированных с почвенной микробиотой, проведен анализ распространенности генов фиксации азота и солюбилизации фосфатов, получены

препараты тотальной ДНК из образцов, на основе которых сконструированы геномные и метагеномные библиотеки и проведено высокопроизводительное секвенирование полученных геномных и метагеномных библиотек, с помощью разработанных на прошлых этапах проекта подходов были найдены микроорганизмы, имеющие новые ферменты, важные для развития генетических технологий, а именно ДНК-полимеразы, эндонуклеазы рестрикции и эндонуклеазы семейства CRISPR/Cas. Таким образом, все собранные школьниками и гражданскими учеными образцы почвы были проанализированы либо с помощью исследовательских школьных наборов, либо в лабораторных условиях на наличие целевой активности.

ВВЕДЕНИЕ

Проект «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» направлен на решение важнейших задач современности – поиск ферментов, важных для развития генетических технологий и поиск новых средств борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами, а также направлен на поиск микроорганизмов и конструирование искусственных микробных консорциумов, стимулирующих рост растений.

Использованная в рамках третьего этапа проекта технология проведения массовых гражданских экспериментов позволила провести исследование микробиологических сообществ на обширных территориях Российской Федерации в целях решения задач генетических технологий и поиска новых штаммов-продуцентов перспективных продуктов, в том числе новых противомикробных препаратов и ферментов с уникальными свойствами.

Направления исследований, в соответствии с их спецификой, распределены между отдельными научными коллективами мирового уровня из четырех научных организаций и двух ВУЗов, располагающих самым современным оборудованием для проведения планируемых работ: Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Сколковский институт науки и технологий, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Институт почвоведения и агрохимии СО РАН, Пущинский научный центр биологических исследований РАН и Научно-технологический университет «Сириус». Фонд «Поддержка проектов в области образования» выступает координатором между общеобразовательными учреждениями, участвующими в массовом эксперименте, и участниками научных направлений.

Реализация мероприятий плана-графика и решение конкретных задач исследовательской программы на втором этапе проекта были разделены на отдельные блоки:

Образовательный блок включал мероприятия по мобилизации обучающихся и неспециалистов (гражданских ученых), обеспечение и сопровождение их исследований и таким образом, проведение массового эксперимента по сбору и анализу образцов почвы на территории Российской Федерации, а также подготовку кадров и развитие кадрового потенциала.

Отдельной задачей третьего этапа проекта является пополнение единой электронной платформы первичной системы учета образцов почвы (<https://atlas.niboch.nsc.ru/>), которая выступает основной пополняемой интерактивной базы данных, включающей результаты

анализа целевых свойств отдельных почвенных изолятов, а также полно- и метагеномных данных секвенирования микробных сообществ в собранных образцах.

В рамках блока задач по поиску микроорганизмов, которые могут обладать ферментами с новыми свойствами был осуществлен поиск новых протеаз, а также ДНК-процессирующих ферментов трех разных классов: высокоточные термостабильные ДНК-полимеразы, эндонуклеазы рестрикции и новые ферменты семейства CRISPR-Cas эндонуклеаз. За отчетный период получены штаммы-продуценты и рекомбинантные белковые препараты пяти новых термостабильных ДНК-полимераз, двух эндонуклеаз рестрикции и одной эндонуклеазы семейства Cas9. Анализ протеолитической активности образцов, полученных первичным скринингом обучающимися и поступивших в ИХБФМ СО РАН, позволил выявить новые штаммы бактерий, обладающие протеолитической активностью в нормальных, психрофильных, термофильных, щелочных или галофильных условиях.

В рамках реализации блока задач по поиску продуцентов антибиотиков проведено культивирование почвенных микроорганизмов и анализ их антибактериальной и антифунгиальной активности. С помощью разработанной и апробированной в рамках реализации проекта флуоресцентной репортерной системы был проведен анализ более 4500 микроорганизмов и обнаружено 284 штаммов, культуральные жидкости или блоки которых продемонстрировали антибактериальную активность. При этом более 4800 микроорганизмов было проанализовано методом лунок, что позволило дополнительно выявить 224 штамма, обладающих антибактериальной активностью и 89 штаммов продемонстрировавших антифунгиальную активность. Проведена работа по массовому культивированию наиболее активных штаммов-продуцентов антибиотиков, с целью идентификации образуемых ими веществ. При изучении антибактериальной активности за отчетный период обнаружено и проанализировано 50 новых бактериофагов.

В результате массового скрининга почвенных микроорганизмов обнаружено 508 штаммов, обладающих комплексом признаков полезных для растений. Для 184 штаммов проведена количественная оценка активности роста на безазотной среде, продукции аммония, сидерофоров, гетероауксина, фосфатмобилизирующей активности. На основе штаммов, обладающих наилучшими сочетаниями свойств полезных для растений проведено конструирование консорциумов микробных сообществ. Обнаружен штамм *Enterobacter ludwigii*, показавший высокую способность к росту в безазотной среде, повышающий доступность фосфатов и имеющий высокие показатели продукции гормона роста у растений (ауксина). Показано, что данные бактерии благоприятно влияют на пшеницу не только в обычных условиях, но и в условиях засухи.

Достигнутые результаты исследовательской программы (проекта) и оценка их востребованности

В рамках реализации третьего этапа проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» проведена мобилизация учащихся, педагогов и активных групп населения для проведения всероссийского масштабного гражданского исследования. Привлечение обучающихся осуществлялось в рамках сетевого исследовательского проекта, связанного со сбором и первичным скринингом образцов. Для осуществления общих информационных коммуникаций использовали сайт проекта (<https://microbeatlas.ru>), содержащий актуальную информацию об этапах реализации проекта. Для масштабного привлечения и мотивации участников разработаны промо-материалы, объясняющие актуальность тематик исследования. Была организована целевая реклама всероссийского масштабного эксперимента для широкого информирования. В реализации проекта в 2023 г. под руководством наставников приняли участие 273 школьные команды из разных регионов Российской Федерации с общей численностью школьников равной 4 241 человек. В отчетном периоде 252 наставника, участвующих в формировании школьных команд, прошли обучение по разработанной в рамках проекта образовательной программе. На регулярной основе проводились консультационные семинары и отчетные конференции обучающихся, на которых были представлены результаты их работы, что позволило мотивировать гражданских участников проекта.

В соответствии с образовательным блоком задач в рамках направления по развитию кадрового потенциала и передачи компетенций в области микробиологических исследований в весеннем семестре 2023 года 71 студент Новосибирского государственного университета успешно освоили курс по образовательной программе «Микробиология», включающий модуль «Медицинская и прикладная микробиология», разработанный в рамках проекта в 2021 году. 28 студентов Новосибирского государственного университета, приступившие к выполнению дипломной работы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН успешно прошли практикум по микробиологии, разработанный в рамках проекта в 2022 году.

В г. Новосибирск с 22 по 25 сентября 2023 года проведена Всероссийская конференция "От микробиологии к генетическим технологиям". В ходе конференции прошло обсуждение вопросов поиска и получения новых штаммов-продуцентов перспективных продуктов, например ферментов с новыми свойствами; поиска почвенных микроорганизмов и конструирования искусственных микробных консорциумов стимулирующих рост растений, поиска новых антибиотиков и проблемы

антибиотикорезистентности микроорганизмов, а также способов ее преодоления, отдельная секция посвящена экологическим и прикладным аспектам бактериофагов, которые могут открыть новые возможности для решения проблемы борьбы с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами. В обсуждении современных вызовов научно-технического прогресса в данных областях приняли участие 177 ученых, представителей академической, вузовской и прикладной науки из различных регионов России. Число молодых исследователей до 39 лет, участников конференции, составило 121 человек.

В отчетный период были проведены стажировки четырех членов научного коллектива в возрасте до 39 лет в ведущих российских научных организациях.

Научным коллективом разработаны адаптированные для неспециалистов методики проведения первичных экспериментов с образцами почвы. В 2023 году произведено 2000 наборов для тестирования образцов на разные типы биологической активности: 516 наборов по отбору почвенных образцов, 500 наборов реагентов по поиску азотфиксирующих бактерий, 424 набора «Первичный скрининг микроорганизмов, улучшающих плодородие почв», 60 наборов «Первичный скрининг штаммов-продуцентов протеаз», 300 наборов «Первичный скрининг продуцентов антибиотиков», 200 наборов для изучения влияния синтетических микробных консорциумов (СМК) на рост и развитие важных сельскохозяйственных культур.

Число образцов почвы, собранных за отчетный период, составило более 10000, основная их часть хранится на складе Получателя. Кроме того, в 2023 году в ИХБФМ СО РАН поступило более 2400 пробирок с питательной средой, содержащих смесь почвенных микроорганизмов, которые были получены обучающимися при выполнении ими первичного скрининга образцов почвы в соответствии с их исследовательскими наборами. Дополнительно, за отчетный период из части полученных образцов почвы в научных организациях консорциума были культивированы около 4000 микроорганизмов. Следует отметить, что все полученные от обучающихся и культивированные в 2023 году микроорганизмы, а также часть микроорганизмов, изолированных на прошлом этапе, были использованы для дальнейшего изучения их целевых свойств. Общая численность исследованных в 2023 году образцов почвы и образцов микроорганизмов, использованных для анализа различных целевых свойств, превысила 27 000 при плановом значении 14 500.

Образцы почвы, собранные как обучающимися, так и исполнителями проекта, были внесены в специально разработанную систему на сайте ИХБФМ СО РАН (<https://atlas.niboch.nsc.ru/>). Регистрация включает присваивание уникального идентификатора и обширный перечень характеристик образца, – эти данные составляют первый уровень атласа почвенных микроорганизмов. Зарегистрированные в базе и

поступившие в научные организации образцы далее были распределены между научными группами, отвечающими за исследование разных типов целевой активности микроорганизмов, культивируемых из образцов почвы, а именно поиск продуцентов антибиотиков, поиск бактериофагов, поиск новых ферментов, поиск микроорганизмов, стимулирующих рост сельскохозяйственных культур. Все эти направления связаны с мета- и полногеномным секвенированием образцов, необходимым для определения видового состава микроорганизмов в почве, таксономического определения отдельных штаммов, выявления последовательностей целевых генов, отвечающих за специфическую активность. По мере исследования свойств почвенных изолятов в научных организациях происходило заполнение второго уровня атласа, в котором с образцом почвы были ассоциированы микроорганизмы, протестированные на разные типы активности. Для визуализации мест сбора почвенных образцов на территории Российской Федерации создана интерактивная карта, связывающая место сбора образца с результатами его исследования.

Научные исследования поступивших образцов почвы проводились во всех организациях-соисполнителях проекта.

В рамках блока задач по поиску микроорганизмов, которые могут обладать ферментами с новыми свойствами был осуществлен поиск новых протеаз, а также ДНК-процессирующих ферментов трех разных классов: высокоточные термостабильные ДНК-полимеразы, эндонуклеазы рестрикции и новые ферменты семейства CRISPR-Cas эндонуклеаз. За отчетный период получены рекомбинантные штаммы-продуценты пяти термостабильных ДНК-полимераз, двух эндонуклеаз рестрикции и одной эндонуклеазы семейства Cas9. Анализ протеолитической активности 1325 образцов, полученных первичным скринингом обучающимися в соответствии с исследовательским набором и поступивших в ИХБФМ СО РАН, позволил выявить 189 индивидуальных штаммов бактерий, имеющих протеолитическую активность: 15 штаммов в психрофильных условиях, 2 штамма в термофильных, 73 штамма в нормальных, 51 штамм в щелочных и 48 штаммов в галофильных условиях.

В рамках реализации блока задач по поиску продуцентов антибиотиков, с помощью разработанной в рамках проекта флуоресцентной репортерной системы, был проведен анализ антибактериальной активности более 4500 микроорганизмов, что позволило выявить 284 штамма, обладающих антибактериальной активностью. Кроме того, для 4870 микроорганизмов проведен анализ антибактериальной активности методом лунок и антимикотической активности, выявивший 224 штамма, обладающих антибактериальной активностью. При этом 20 штаммов обладали антагонистической активностью

относительно 2-х видов бактерий; 4 штамма – относительно 3-х видов бактерий; 1 штамм – относительно 4-х видов бактерий. За отчетный период было идентифицировано 89 штаммов, продемонстрировавших антифунгиальную активность. Проведена работа по массовому культивированию наиболее активных штаммов-продуцентов антибиотиков, с целью идентификации образуемых ими веществ с использованием методов масс-спектрометрического анализа.

При изучении антибактериальной активности за отчетный период обнаружено и проанализировано 50 новых бактериофагов. На основе гена термостабильного фагового эндолизина создан рекомбинантный препарат, эффективно разрушающий биопленки, сформированные различными видами стафилококков. В 2022 году подана заявка, а в 2023 году получен патент № RU 2809842, дата регистрации 19.12.2023, на продуцент рекомбинантного белка LysAP46 и рекомбинантный белок LysAP46, обладающий антибактериальным действием.

В результате массового скрининга почвенных микроорганизмов отобраны 508 индивидуальных штаммов бактерий, из них 479 проявляют азотфиксирующую и 29 - фосфатмобилизирующую активность. Для 184 штаммов проведена количественная оценка активности роста на безазотной среде, продукции аммония, сидерофоров, гетероауксина, фосфатмобилизирующей активности. На основе штаммов, обладающих наилучшими сочетаниями свойств полезных для растений проведено конструирование консорциумов микробных сообществ. Обнаружен штамм *Enterobacter ludwigii*, показавший высокую способность к росту в безазотной среде, повышающий доступность фосфатов и имеющий высокие показатели продукции гормона роста у растений (ауксина). Показано, что данные бактерии благоприятно влияют на пшеницу не только в обычных условиях, но и в условиях засухи.

В 2023 году выполнено полногеномное секвенирование 50 бактериофагов и 84 бактерий и проведено полное метагеномное секвенирование 10 образцов почвы.

Таким образом, в ходе реализации третьего этапа были полностью выполнены все поставленные задачи и достигнуты целевые показатели проекта. Сведения о ходе выполнения исследовательской программы размещены на сайте ИХБФМ СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/science/grants/gk/075-15-2021-1085>). В ходе выполнения третьего этапа исследовательской программы успешно реализованы все мероприятия по организации масштабных исследований с привлечением методов гражданской науки и получен большой массив новой информации для перспективных разработок на основе генетических технологий в соответствии с целью исследовательской программы: «Проведение на территории Российской Федерации масштабных исследований

с участием ведущих ученых и привлечением обучающихся для сбора образцов и анализа данных и результатов». На базе созданной образовательной и экспериментальной платформы на следующих этапах реализации проекта возможно долгосрочное развитие данной программы для проведения систематических исследований на всей территории РФ.

Конкретные предложения по дальнейшему развитию исследований и практической реализации полученных результатов представлены в соответствии с отдельными направлениями работы:

1) Применение бактериофагов в ветеринарии

Созданную коллекцию штаммов бактериофагов активных в отношении возбудителей бактериозов с.-х. животных и рыб планируется использовать для внедрения в ветеринарной медицине. Зарегистрированные штаммы бактериофагов и бактерий-продуцентов планируется реализовывать для организаций, занимающихся терапией и профилактикой бактериальных инфекций таких как сальмонеллез и эшерихиоз у кур и свиней, аэромоназов рыб. Организация готова приобрести противосальмонеллезные бактериофаги, бактериофаги активные в отношении *Aeromonas spp* - Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского федерального центра агrobiотехнологий РАН. Ожидаемый результат за 2024 г - продажа 3-х штаммов бактериофагов и штаммов-хозяев с целью применения в качестве средства профилактики аэромоназа рыб, сальмонеллеза кур, эшерихиоза свиней/кур. Также совместно с ИЭВСиДВ СФНЦА РАН будет разработан проект инструкции по применению противосальмонеллезного бактериофага на птицефабриках и/или разработаны и утверждены методические рекомендации по профилактике санитарно-значимых инфекций, вызванных представителями сем. *Enterobacteriaceae* у с.-х. птицы, с использованием бактериофагов. Для этого в 2024 году будут проведены работы по оценке спектра фагорезистентности изолятов сальмонелл и кишечной палочки у с.-х. животных, разработана технология применения бактериофагов в условиях крупной птицефабрики для профилактики сальмонеллеза и данные по ее эффективности и дано заключение об эффективности фаготерапии и профилактики эшерихиозов.

2) Применение рекомбинантного фагового эндолизина в сельском хозяйстве и медицине

С целью замены антибиотиков при терапии маститов у коров и снижения риска попадания антибиотиков и антибиотикоустойчивых микроорганизмов в молоко и молочные продукты планируется применять препараты фагового эндолизина (активного в отношении грамотрицательных бактерий) путем их интрацистернального введения.

Организации, заинтересованные во внедрении препаратов рекомбинантного фагового эндолизина в качестве фарм сырья на рынок – ООО “Росветфарм”, ООО “Трионис Вет”. Организации готовы принять участие в клинических испытаниях препарата фагового эндолизина на молочно-товарных фермах ОПХ Элитное и Уч.хоз. Тулинское – ИЭВСиДВ СФНЦА РАН и ФГБОУ ВО НГАУ. Ожидаемые результаты: совместное выполнение доклинических исследований для формирования регистрационного досье, разработка проекта ТУ на фармакологическую субстанцию для местного или перорального применения, подписание соглашения с компанией производителем, начало клинических испытаний на коровах с маститами (за год не менее 20 голов КРС), разработка проекта наставления по применению. В ходе выполнения работ будет получено теоретическое и экспериментальное обоснование компонентного состава препарата для терапии маститов, включающего фагового эндолизина, будет установлен спектр активности препарата фагового эндолизина в отношении возбудителей маститов в РФ.

С целью медицинского применения препарата фагового эндолизина будут проведены основные этапы доклинических исследований, включающие данные о терапевтической активности препарата в *in vivo* модели стафилококковой инфекции; данные о физико-химических свойствах и стабильности препарата фагового эндолизина LysAP46 и данные о токсичности. Предварительно будет разработана лабораторная технология масштабированного получения препарата фагового эндолизина и получены экспериментальные образцы; составлен лабораторный регламент. Согласование условий и заключение лицензионного договора с индустриальным партнером.

3) Применение антагонистически-активных штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* для санации подстилки в птичниках от условно-патогенных микроорганизмов

Компания заинтересованные в приобретении штаммов микроорганизмов с антагонистической активностью для производства препарата для санации подстилки – ООО “СибАФ”. На сегодняшний день в коллекции микроорганизмов Получателя содержится более 500 штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*, часть из которых является антагонистически-активными в отношении сальмонелл, стрептококков, стафилококков в т.ч. клинических изолятов, выделенных от птиц и свиней. Практический результат на конец 2024 года: будет разработано эффективное средство для санации подстилки в отношении микробиоценозов подстилки, включая условно-патогенную микробиоту, депонирование не менее 3-х штаммов-антагонистов в ВКПМ ГосНИИ Генетика, будут утверждены технические условия на средство для санации подстилки и разработан проект инструкции по применению бактериального препарата.

4) Использование созданной коллекции микроорганизмов для развития промышленного производства грибов

От компания ООО “СибБиоФарм” поступил запрос на штаммы-продуценты целлюлаз, сохраняющие активность при температурах 50-65°C в пометно-подстилочной смеси для изготовления субстрата, на котором выращивают шампиньоны. Созданная коллекция микроорганизмов будет использована для поиска штаммов, пригодных для переработки пометно-подстилочной массы в условиях самосогревания помета. Эти штаммы будут апробированы в условиях промышленного приготовления грибов, а также для утилизации помета методом биотермического обеззараживания, с сохранением оптимальных ростовых свойств для с.-х. растений и грибов в качестве органического удобрения.

5) Штаммы-продуценты протеаз и целлюлаз, востребованных в сельском хозяйстве для приготовления кормов

В ходе реализации проекта обнаружено, охарактеризовано и депонировано 256 штаммов-продуцентов протеаз. Кроме того, штаммы-продуценты термостабильных целлюлаз востребованы в современной комбикормовой промышленности при приготовлении кормов для птиц и свиней, которые проходят грануляцию при температуре не ниже 70°C. Для дальнейшего использования найденных штаммов для производства кормовых добавок требуется проведение оценки штаммов на соответствие промышленным стандартам: продуктивность, скорость роста (коэффициент выхода биомассы), устойчивость культуры и продукта к температурам 70-100°C стабильность культуры в пассажах, хранении; технологичность культивирования; возможность масштабирования процессов, доступность сырья на производство конкретной товарной формы (доля расходов на сырье должна составлять не более 25% от планируемой рыночной цены препарата данной товарной формы), а также экологических характеристик: фагоустойчивость; генетическая стабильность; продукты микробиологического синтеза должны быть безвредны для человека и окружающей среды. После проведения данных испытаний возможно депонирование штаммов микроорганизмов во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов.

б) Микробиологические препараты-биоудобрения на основе консорциумов микробных сообществ для стимулирования роста растений

В результате работ по поиску микроорганизмов, проявляющих свойства полезные для растений, в 2021-2023 году было отобрано более 1000 различных штаммов, показавших совокупность или высокую способность к фиксации азота, фосфатмобилизации, продукции ауксина или сидерофоров. Среди штаммов, отобраны несколько, для которых проведено

полногеномное секвенирование, оценка их положительного влияния на рост растений, а также для некоторых – влияние на экспрессию генов пшеницы. Для дальнейшего использования данных штаммов для производства биоудобрений требуется проведение оценки штаммов на соответствие промышленным стандартам: продуктивность, скорость роста (коэффициент выхода биомассы), температурная устойчивость, кислотная устойчивость; рост на рентабельных (дешевых и доступных) субстратах, а также экологических характеристик: фагоустойчивость; генетическая стабильность; продукты микробиологического синтеза должны быть безвредны для человека и окружающей среды. После проведения данных испытаний возможно депонирование штаммов микроорганизмов во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов или Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН (ВКСМ). Также в результате исследований, проведенных на препаратах производителя органической подкормки ТОР (ООО «СТАНЦИЯ – А») был получен список микроорганизмов, которые должны присутствовать на различных стадиях изготовления биоудобрения. В результате совместной работы от производителей был сформулирован запрос на разработку тест-систем для контроля качества получаемых биоудобрений. Практический результат на конец 2024 года: разработка, апробация и регистрация тест-системы для ПЦР-диагностики наличия бактерий определенных родов в составе биоудобрений.

7) Анализ влияния консорциумов почвенных бактерий, на рост и развитие сахарной свеклы

Заключен договор о сотрудничестве между ИХБФМ СО РАН и АО "Русагро". В рамках сотрудничества будут выполнены следующие работы: планируются эксперименты в чашках Петри для анализа стимулирования развития проростков семян сахарной свеклы. Будут эксперименты в закрытом грунте для подбора оптимального внесения минеральных удобрений в сочетании с консорциумами почвенных бактерий и периода внесения бактериальных препаратов либо инокуляция семян. Эксперименты с внесением консорциумов будут выполнены в трех регионах присутствия АО "Русагро" (например, Тамбовская, Белгородская, Курская, Орловская и Воронежская области). Для экспериментов в закрытом грунте будет использована почва с сельскохозяйственных полей АО "Русагро". Эксперименты в регионах планируется проводить с привлечением "гражданских ученых", посевной материал будет предоставлен АО "Русагро", лиофилизированные консорциумы – ИХБФМ СО РАН. По итогам полевых испытаний предполагается лицензирование использования консорциумов АО "Русагро". Производство

опытных партий возможно с использованием мощностей ООО "ПО Сиббиофарм" (Новосибирская обл., г. Бердск).

8) Штаммы-продуценты эндонуклеаз семейства CRISPR-Cas

В ходе реализации проекта за первые три года был разработан пайплайн, позволяющий выявлять гены новых нуклеаз Cas9 и получать их рекомбинантные аналоги с определением последовательностей PAM. С помощью данного подхода получен рекомбинантный препарат нуклеазы Cas9 из *Anoxybacillus flavithermus*. В 2024 году будет заключен лицензионный договор между ООО Биолабмикс и ИХБФМ СО РАН на использование данного фермента, для этого будет разработано техническое описание, инструкции по использованию и внедрение полученного белка в каталог компании Биолабмикс. С использованием данного пайплайна будет проведен поиск новых вариантов Cas9, которые обладают активностью в иных диапазонах температур или с иными вариантами последовательностей PAM. Такое поисковое исследование будет включать в себя получение новых геномных данных (секвенирование полных геномов бактерий из различных природных источников); анализ имеющихся геномных данных; синтез гена, кодирующего нуклеазу Cas9 (с оптимизацией кодонов при необходимости); конструирование экспрессионной кассеты и получение продуцента; разработка хроматографического протокола и получение чистого препарата белка. Далее будет проведено молекулярно-биологическое и биохимическое исследование, которое позволит описать активность и определить последовательность PAM.

9) Рекомбинантные термостабильные высокоточные ДНК-полимеразы

ДНК-зависимые ДНК-полимеразы лежат в основе многочисленных биотехнологических и диагностических приложений и используются для манипуляций с ДНК, включая клонирование, ПЦР, сайт-направленный мутагенез, секвенирование и другие. В связи с этим непрерывно ведется поиск новых ферментов для генетических технологий, которые могут иметь улучшенные свойства по сравнению с известными на сегодняшний день. В ходе реализации проекта создано 18 штаммов-продуцентов ДНК-полимераз, включая как природные варианты, так и их мутантные и химерные варианты, созданные методами рационального дизайна с целью улучшения таких свойств, как процессивность (способность синтеза протяженных ампликонов) и точность. Семь созданных штаммов-продуцентов депонировано в коллекции микроорганизмов ИХБФМ СО РАН, подана заявка на патентование способа получения одного из ферментов. В отчетный период получены очищенные препараты всех созданных ДНК-полимераз и определена активность новых ДНК-полимераз и их основные биотехнологически важные свойства: термостабильность, процессивность и точность, по сравнению с известными

ДНК-полимеразами Pfu и Taq, используемыми в ПЦР в настоящее время. В ходе реализации проекта в 2024 году будет подготовлен комплект документов, необходимый для регистрации РИД по ряду ДНК-полимераз, обладающих улучшенными свойствами по процессивности и точности. В 2024 году будет подготовлена техническая документация на новые рекомбинантные препараты ДНК-полимераз, содержащая характеристики, необходимые для заинтересованных индустриальных партнеров. В расширении линейки коммерчески доступных ДНК-полимераз заинтересованы ООО «СибЭнзайм», ООО «БИОСАН» и ООО «Биолабмикс». Будут согласованы условия и заключен лицензионный договор с индустриальным партнером на использование новых термостабильных высокоточных ДНК-полимераз.

По каждому из представленных типов продукции ИХБФМ СО РАН разработал план-график проведения исследований и внедрения результатов проекта и провел переговоры с профильными компаниями фармацевтического, биотехнологического или сельскохозяйственного профиля. Выполнение мероприятий в рамках плана-графика по внедрению результатов проекта позволит внести существенный вклад в достижение целей и показателей Федеральной программы «Генетические технологии для развития сельского хозяйства» и позволит внедрить продукцию, отвечающую требованиям технологической независимости Российской Федерации.

Создание конкурентоспособного на мировом уровне научного коллектива

Каждое направление исследований данного проекта закреплено за отдельными научными коллективами мирового уровня из шести организаций, располагающих самым современным оборудованием для проведения планируемых работ: Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Сколковский институт науки и технологий, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Институт почвоведения и агрохимии СО РАН, Пущинский научный центр биологических исследований РАН и Научно-технологический университет «Сириус». Фонд «Поддержка проектов в области образования» выступает координатором между общеобразовательными учреждениями, участвующими в массовом эксперименте, и участниками научных направлений.

Коллектив исполнителей включает 63,9% сотрудников в возрасте до 39 лет, сбалансированно распределенных между всеми блоками исследовательской программы.

Коллектив основных исполнителей за последние пять лет принимал участие в успешной реализации большого числа проектов международного уровня, перечисленных в

сведениях об основных исполнителях проекта, и имеет необходимый опыт для успешной реализации исследовательской программы.

Участники проекта имеют прямой и многолетний опыт внедрения разработок по направлению биотехнологии: разработаны технологии наработки и очистки ферментов для генетических технологий, в частности, ДНК- и РНК-зависимых ДНК-полимераз, протеаз и эндонуклеаз, востребованных в научных исследованиях и биомедицинских технологиях; созданы наборы для амплификации и количественного определения нуклеиновых кислот (ПЦР, ОТ-ПЦР, обратная транскрипция); разработана серия протоколов и наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот (как ДНК, так и РНК) из клеток и тканей, а также реакционных смесей; разработаны протоколы ферментативного синтеза коротких и протяженных РНК, созданы наборы реагентов для высокоэффективного синтеза РНК *in vitro* и другие.

Подготовка кадров и развитие кадрового потенциала

В рамках реализации мероприятий по подготовке высококвалифицированных кадров реализована основная профессиональная образовательная программа высшего образования «Медицинская и прикладная микробиология» по направлению подготовки 060401 «Биология», соответствующей Федеральному государственному стандарту высшего образования. В 2023 году 71 студент Факультета естественных наук Новосибирского государственного университета прошли обучение по данной программе.

В отчетном периоде 28 студентов, поступивших в ИХБФМ СО РАН для выполнения дипломной практики, успешно освоили программу «Практикум по медицинской и прикладной микробиологии» по направлению подготовки 060401 «Биология» и 060301 «Биология», соответствующий Федеральному государственному стандарту высшего образования.

В реализации проекта в 2023 г. под руководством наставников приняли участие 273 школьные команды из разных регионов Российской Федерации с общей численностью школьников равной 4 241 человек. Наставники, участвующие в проекте в отчетном периоде прошли обучение по разработанной в рамках проекта образовательной программе. На регулярной основе проводились консультационные семинары и отчетные конференции обучающихся, на которых были представлены результаты их работы, что позволило мотивировать гражданских участников проекта.

Проведена Всероссийская конференция "Высокопроизводительное секвенирование в геномике", включающая доклады в таких областях как геномика эукариот и прокариот, метагеномика сообществ микроорганизмов, медицинская геномика, транскриптомика,

белково-нуклеиновые взаимодействия и трансляция. В конференции участвовало более 170 участников из 37 организаций. Число молодых исследователей до 39 лет, участников конференции, составило 121 человек.

В отчетный период были проведены стажировки четырех членов научного коллектива в возрасте до 39 лет в ведущих российских научных организациях.

Создание и развитие лабораторий и центров, осуществляющих исследования в области генетических технологий, в частности технологий генетического редактирования, и их техническая поддержка, по направлениям реализации Федеральной программы

Для реализации проекта в 2023 году в ИХБФМ СО РАН поддержано развитие центра коллективного пользования «Центр прикладной микробиологии» (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/ckp-csm>), который был создан в 2022 году в рамках реализации мероприятий исследовательской программы.

Основные задачи центра коллективного пользования «Центр прикладной микробиологии» включают:

Поиск и анализ природных консорциумов микроорганизмов на наличие азотфиксирующих и фосфат солюбилизирующих бактерий.

Обработку методов скрининга индивидуальных микроорганизмов и их консорциумов в лабораторных условиях.

Анализ генов фиксации азота и солюбилизации фосфатов в сообществах почвенных бактерий.

Создание и тестирование *in vitro* и в природных условиях композиций азотфиксирующих и фосфат солюбилизирующих бактерий, улучшающих плодородие для агроценозов.

Отбор и культивирование бактериальных штаммов, обладающих протеолитическими свойствами, видовая и генотипическая идентификация.

Определение субстратной специфичности обнаруженных протеаз и эффективности их наработки бактериями, определение оптимальных условий окружающей среды, необходимых для работы фермента.

В 2023 году поддержано развитие Лаборатории молекулярной генетики под руководством к.б.н. Е.Н. Ворониной (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/labs/moleculargengroup>). Для проведения микробиологических работ в лабораторию были закуплены все необходимые материалы и

оборудование. Сотрудниками лаборатории проведен анализ и первичный посев культур, получаемых от школьников, их очистка, первичное морфологическое описание и депонирование. Для описания свойств штаммов, полезных для растений, были использованы методики спектрофотометрической оценки активности фосфатсольюбилизации, продукции сидерофоров и биологически активных веществ.